

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 046 627 A2

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:
25.10.2000 Bulletin 2000/43

(51) Int Cl.7: **C07B 57/00**, C07C 275/24,
C07C 227/30, C07C 271/54,
C07C 333/04

(21) Numéro de dépôt: **00201285.4**

(22) Date de dépôt: **10.04.2000**

(84) Etats contractants désignés:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**
Etats d'extension désignés:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorité: **21.04.1999 BE 9900280**

(71) Demandeur: **SOLVAY (Société Anonyme)**
1050 Bruxelles (BE)

(72) Inventeurs:
• **Delplanche, Thierry**
1348 Ottignies-Louvain-la-Neuve (BE)
• **Callens, Roland**
1850 Grimbergen (BE)

(74) Mandataire: **Jacques, Philippe et al**
Solvay S.A.
Département Propriété Industrielle
310, rue de Ransbeek
1120 Bruxelles (BE)

(54) **Procédé pour la séparation d'énantiomères et réactif énantio pur**

(57) Procédé pour la séparation d'énantiomères
comprenant au moins un groupement fonctionnel libre

dans lequel on fait réagir en milieu basique un réactif à
base d'un aminoacide énantio pur avec un mélange
comprenant des énantiomères.

EP 1 046 627 A2

Description

[0001] L'invention se rapporte à un procédé pour la séparation d'énantiomères et à des réactifs à base d'un aminoacide énantiopur, utilisables en séparation d'énantiomères.

[0002] La séparation d'énantiomères est une question de grande importance en industrie pharmaceutique, chimique et biotechnologique. En effet les deux énantiomères d'une substance chimique de constitution identique peuvent avoir des activités biologiques radicalement différentes. Il est ainsi souhaitable de disposer de réactifs et de techniques de séparation permettant de séparer les énantiomères et d'analyser la pureté énantiomérique des produits pharmaceutiques, chimiques et biotechnologiques.

[0003] Un article de Marfey, P., (Carlsberg Res. Comm. 49, 1984, 591-596) décrit un procédé de séparation d'énantiomères par RP-HPLC. Selon ce procédé connu, on met en oeuvre du 1-Fluoro-2,4-dinitrophényl-5-L-Alaninamide à titre de réactif pour la dérivation d'aminoacides. D'autres procédés similaires sont également connus. Le procédé et réactif décrits par Marfey ainsi que les autres procédés et réactifs présentent toutefois de nombreux inconvénients.

[0004] Le dérivé obtenu dans la réaction de l'acide amino avec le réactif doit être isolé par des opérations successives de neutralisation, de séchage, de redissolution et de filtration. Ces opérations demandent beaucoup de temps et sont donc peu intéressantes pour une application industrielle. De plus on risque, dans des cas d'applications analytiques, des erreurs dans les résultats d'analyse, causées par une solubilité différente des dérivés diastéréomériques dans le solvant de redissolution. Lorsqu'on effectue des analyses quantitatives à l'aide de la spectrométrie UV, on rencontre, dans le procédé connu, des difficultés dues à des différences de coefficient d'absorption des dérivés diastéréomériques.

Enfin, le prix élevé du réactif rend souhaitable de trouver des alternatives.

[0005] L'invention vise à remédier à ces problèmes.

[0006] L'invention concerne dès lors un procédé pour la séparation d'énantiomères comprenant au moins un groupement fonctionnel libre dans lequel

(a) on fait réagir un mélange comprenant les énantiomères en milieu basique avec un réactif à base d'un aminoacide énantiopur, réactif dans lequel au moins un groupement amino de l'acide amino porte un groupement activant pour former un précurseur actif d'un groupement isocyanate et dans lequel au moins un groupement carboxyle de l'acide amino est substitué et

(b) on soumet le mélange de diastéréomères obtenu à une opération de séparation.

[0007] Il a été trouvé, de manière surprenante, que le procédé selon l'invention permet d'obtenir de bons résultats en séparation d'énantiomères comprenant au moins un groupement fonctionnel libre, notamment dans des applications analytiques quantitatives. Le procédé selon l'invention permet une dérivation et séparation d'énantiomères, rapides et sous des conditions souples et économiques.

[0008] L'invention concerne aussi un réactif à base d'un aminoacide énantiopur dans lequel au moins un groupement amino de l'acide amino porte un groupement activant pour former un précurseur actif d'un groupement isocyanate et dans lequel au moins un groupement carboxyle de l'acide amino est substitué.

[0009] Par acide amino on entend désigner, aux fins de la présente invention tout composé comprenant au moins un groupement NH_2 et au moins un groupement carboxyle. Les acides aminés utilisés dans la présente invention sont des acides aminés chiraux contenant au moins un carbone asymétrique. On peut mettre en oeuvre tout acide amino chiral bien connu en lui-même, d'origine naturelle ou synthétique.

[0010] Des exemples de réactifs selon l'invention sont à base, par exemple, des acides aminés naturels suivants : Alanine, Valine, Norvaline, Leucine, Norleucine, Isoleucine, Sérine, Isosérine, Homosérine, Thréonine, Allothréonine, Méthionine, Ethionine, Acide Glutamique, Acide Aspartique, Asparagine, Cystéine, Cystine, Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane, Lysine, Arginine, Histidine, Ornithine, Glutamine et Citrulline.

[0011] Les énantiomères non naturels sont également utilisables.

[0012] Des exemples d'acides aminés d'origine synthétique utilisables comme base du réactif selon l'invention comprennent, par exemple, les acides aminés suivants : (1-Naphtyl)alanine, (2-Naphtyl)alanine, Homophénylalanine, (4-Chlorophényl)alanine, (4-Fluorophényl)alanine, (3-Pyridyl)alanine, Phénylglycine, Acide Diaminopimélique (Acide 2,6-Diaminoheptane-1,7-dioïque), Acide 2-aminobutyrique, Acide-2-aminotétraline-2-carboxylique, Erythro β -Méthylphénylalanine, Threo β -Méthylphénylalanine, (2-Méthoxyphényl)alanine, Acide 1-amino-5-hydroxyindane-2-carboxylique, Acide 2-Aminoheptane-1,7-dioïque, (2,6-Diméthyl-4-hydroxyphényl)alanine, Erythro β -Méthyltyrosine, Threo β -Méthyltyrosine.

[0013] Par acide amino énantiopur on entend désigner un acide amino chiral constitué essentiellement d'un énantiomère. L'excès énantiomérique (e) est défini : $ee(\%) = 100(x_1 - x_2)/(x_1 + x_2)$ avec $x_1 > x_2$; x_1 et x_2 représentent la teneur du mélange en énantiomère 1 ou 2 respectivement.

[0014] On met généralement en oeuvre un acide amino énantiopur dont l'excès énantiomérique est supérieur ou égal à 99 %. On préfère un acide amino énantiopur dont l'excès énantiomérique est supérieur ou égal à 99,5 %. De manière

particulièrement préférée on met en oeuvre un aminoacide énantiopur dont l'excès énantiomérique est supérieur ou égal à 99,9 %.

[0015] Tout aminoacide énantiopur est utilisable comme base du réactif selon l'invention. De préférence l'acide aminoacide énantiopur est sélectionné parmi les aminoacides d'origine naturelle ou synthétique nommés ci-dessus. Les aminoacides comprenant au moins un noyau aromatique tels que par exemple la phénylalanine ou ses dérivés conviennent bien à titre d'acide aminoacide énantiopur. De façon particulièrement préférée, l'acide aminoacide énantiopur est sélectionné parmi la phénylalanine, la (1-naphtyl)alanine, la (2-naphtyl)alanine ou le α ou β tryptophane ((2-indolyl)alanine ou (3-indolyl)alanine), éventuellement substitués.

[0016] Dans le réactif selon l'invention, au moins un groupement amino de l'acide aminoacide énantiopur porte un groupement activant pour former un précurseur actif d'un groupement isocyanate.

[0017] Par précurseur actif d'un groupement isocyanate, on entend désigner tout précurseur qui lorsqu'il est mis en oeuvre dans un solvant utilisable dans le procédé selon l'invention avec un équivalent de phénylalanine en présence de 1 équivalent de base réagit à une température inférieure ou égale à 35 °C en une durée inférieure ou égale à 30 min essentiellement complètement, pour former l'urée correspondant. De préférence le précurseur réactif libre le groupement isocyanate à une température inférieure ou égale à 30 °C en une durée inférieure ou égale à 15 min. De manière tout particulièrement préférée, le précurseur réactif libre le groupement isocyanate à température ambiante en une durée inférieure ou égale à 10 min. Des conditions de test utilisables pour déterminer le précurseur actif sont décrites, par exemple dans l'exemple 3 plus bas.

[0018] Le groupement activant est généralement constitué d'un dérivé carbonyle lié à un substituant électronégatif. On peut par exemple utiliser à titre de groupement activant un groupement aryloxy-carbonyl, hétéroaryloxy-carbonyl, 1,3-imidazolyl-N-carbonyl ou 1,2,4-triazolyl-N-carbonyl. Parmi les groupes aryloxy-carbonyl conviennent bien ceux qui portent au moins un substituant -I, -M sur un noyau aromatique. Un substituant -I, -M est un groupement qui a un effet négatif inductif et de résonance comme défini en J. March, *Advanced Organic Chemistry*, 4. Ed., 1992, p. 17-19, 273-275. Parmi les substituants -I, -M figurent, par exemple -NO₂, -SO₂R, -SO₂OR, -NR₃⁺, SR₂⁺. Les substituants se trouvent de préférence à au moins une des positions 2, 4 ou 6 du noyau aromatique ou à des positions analogues aux positions 2 ou 4 dans des systèmes aromatiques condensés. On préfère utiliser un groupement activant aryloxy-carbonyl qui porte au moins un substituant nitro sur un noyau aromatique. Le groupement (4-nitrophényloxy)carbonyl est particulièrement préféré.

[0019] Dans une variante, le substituant électronégatif comprend un substituant -I (effet négatif inductif) indépendamment de l'effet de résonance (M) tels que définis plus haut. Le groupement activant est dans cette variante, de préférence, un groupement aryloxy-carbonyl porteur d'au moins un substituant -I. Le substituant -I se trouve, de préférence aux positions renseignées plus haut pour les substituants -I, -M. Des exemples de substituants -I utilisables dans le réactif selon l'invention sont, par exemple, les halogènes. Le chlore et le fluor conviennent bien. Le fluor est préféré.

[0020] Dans une variante de l'invention, toutes autres choses restant égales, le réactif est à base d'un aminoacide énantiopur dans lequel au moins un groupement amino de l'acide aminoacide porte un groupement activant pour former un précurseur actif d'un groupement isothiocyanate. On peut par exemple utiliser à titre de groupement activant un groupement thiocarbonyl lié à un groupement électronégatif tel que décrit plus haut. Un groupement (4-nitrophényloxy)thiocarbonyl ou (4-fluorophényloxy)thiocarbonyl est préféré.

[0021] Il a été trouvé que dans cette variante de l'invention la réaction du réactif avec le composé organique comprenant un groupement fonctionnel libre donne généralement lieu à la formation de dérivés comprenant un groupement thiocarbonyl ce qui peut donner une séparation d'énantiomères encore améliorée par rapport aux dérivés oxygénés. La présence de soufre dans les dérivés diastéréomériques facilite encore la détection desdites dérivés, notamment par spectrométrie UV.

[0022] Dans le réactif selon l'invention, au moins un groupement carboxyle de l'acide aminoacide est substitué.

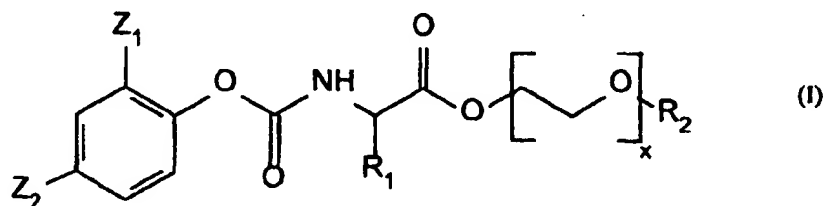
[0023] Généralement, le substituant par lequel le groupement carboxyle de l'acide aminoacide est substitué ne comprend pas de groupement fonctionnel libre, susceptible de réagir avec le précurseur actif. Parmi les substituants utilisables figurent par exemple, les groupements alkyles comprenant de 1 à 4 atomes, linéaires ou ramifiés tels que le groupement méthyl, éthyl, n-propyl, i-propyl, n-butyl, i-butyl ou t-butyl, les éthers, les groupements aryle, les groupements alkyle, éther ou aryle étant éventuellement fonctionnalisés par, par exemple, des halogènes, des esters carboxyliques, sulfoniques, des esters de sulfate, des esters phosphoniques, des esters de phosphate. Conviennent bien les substituants hydrophiles qui assurent une bonne solubilité du réactif dans des mélanges d'eau avec des solvants organiques.

[0024] Le substituant hydrophile assure généralement qu'une solution du réactif dans un mélange dioxane/eau 1 : 1 en volume est homogène à 20 °C lorsque la concentration du réactif est d'au moins 0.5*10⁻³ mol/l. Souvent la concentration est d'au moins 1*10⁻³ mol/l. De préférence la concentration est d'au moins 0.5*10⁻² mol/l. De bons substituants hydrophiles assurent que la solution est homogène à 20 °C lorsque la concentration du réactif est d'au moins 1*10⁻² mol/l.

[0025] On préfère mettre en oeuvre un substituant qui contient au moins une liaison éther. Des exemples de substituants

tituants contenant au moins une liaison éther sont, par exempl , les éthers d'alkyle ou d'aryle de mono- oligo- ou de polyalkylèneglycols tels qu par exemple le mono- oligo ou polyéthylèneglycol ou le mono- oligo- ou polypropylène-glycol. Le substituant 2-méthoxyéthyl est particulièrement préféré.

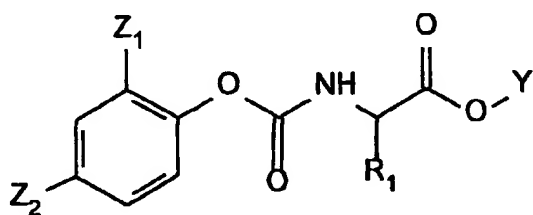
[0026] Des variantes particulièrement préférées du réactif selon l'invention comprenant un substituant hydrophile répondent à la formule générale (I)



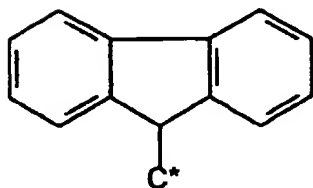
dans laquelle Z_1 et/ou $Z_2 = \text{NO}_2$, $R_1 = \text{Phényl}$, α ou β -Indolyl, 1-Naphtyl ou 2-Naphtyl, $R_2 = \text{Me}$, Et, C3-C6 alkyl ou cycloalkyl et x représente un nombre intégral de 1 à 5.

[0027] Dans une variante, le substituant par lequel le groupement carboxyle de l'acide est substitué, comprend au moins un chromophore. Par chromophore on entend désigner un groupement fonctionnel qui absorbe du rayonnement électromagnétique. Généralement, le maximum d'absorption des chromophores est de 170 à 2500 nm. De préférence le maximum d'absorption des chromophores est de 200 à 1000 nm. Des exemples de chromophores utilisables sont des systèmes aromatiques, éventuellement substitués en position 2 ou 4 par un substituant -I, -M tel que décrit plus haut. Parmi les substituants comprenant au moins un chromophore, les groupements 4-nitrobenzyl, (2-anthraquinoyl)méthyl et (9(9H-fluorényl)méthyl)) sont particulièrement préférés.

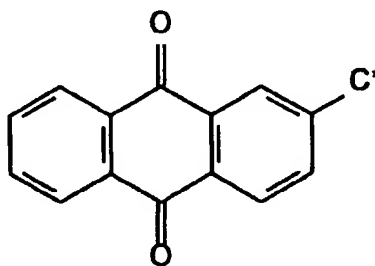
[0028] Des variantes préférées du réactif selon l'invention comprenant au moins un chromophore, répondent à la formule générale (II)



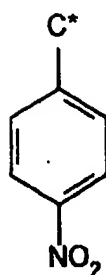
(II)



(III)



(IV)

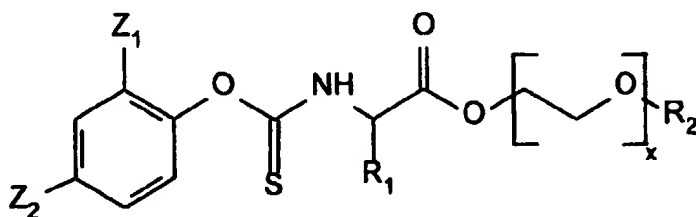


(V)

15 dans laquelle Z_1 et/ou $Z_2 = \text{NO}_2$, $R_1 = \text{Phényl}$, α ou β -Indolyl, 1-Naphtyl ou 2-Naphtyl, et Y correspond à l'une quelconque des formules (III à V), le carbone par lequel Y est lié à l'oxygène du groupement carboxyle de l'acide aminé étant marqué par *.

[0029] On peut mettre en oeuvre un substituant hydrophile comprenant au moins un chromophore.

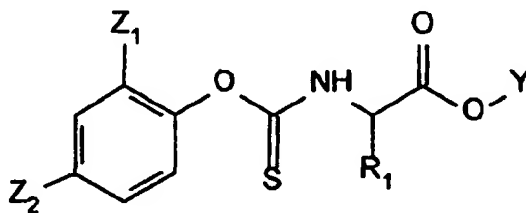
20 [0030] Des variantes particulièrement préférées du réactif selon l'invention comprenant un précurseur actif d'un groupement isothiocyanate et un substituant hydrophile répondent à la formule générale (VI)



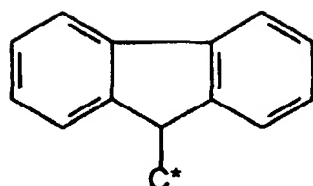
(VI)

35 dans laquelle Z_1 et/ou $Z_2 = \text{NO}_2$ ou F, $R_1 = \text{Phényl}$, α ou β -Indolyl, 1-Naphtyl ou 2-Naphtyl, $R_2 = \text{Me}$, Et, C3-C6 alkyl ou cycloalkyl et x représente un nombre intégral de 1 à 5.

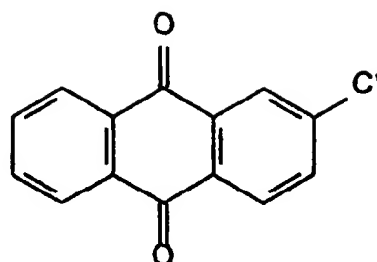
[0031] Des variantes préférées du réactif selon l'invention comprenant un précurseur actif d'un groupement isothiocyanate et au moins un chromophore, répondent à la formule générale (VII)



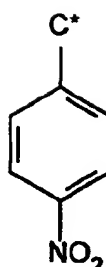
(VII)



(III)



(IV)



(V)

dans laquelle Z_1 et/ou $Z_2 = \text{NO}_2$ $R_1 = \text{Phényl}$, α ou β -Indolyl, 1-Naphtyl ou 2-Naphtyl, et Y correspond à l'une quelconque des formules (III à V), le carbone par lequel Y est lié à l'oxygène du groupement carboxyle de l'acide énantiopur étant marqué par *.

[0032] Lorsque l'acide énantiopur contient plus d'un groupement carboxyle, on préfère protéger tous les groupements carboxyles. De manière particulièrement préférée, tous les groupements carboxyles sont substitués par un substituant tel que décrit plus haut.

[0033] Lorsque des groupements fonctionnels libres sont présents dans l'acide énantiopur, on préfère protéger lesdits groupements par des techniques connues en elles.

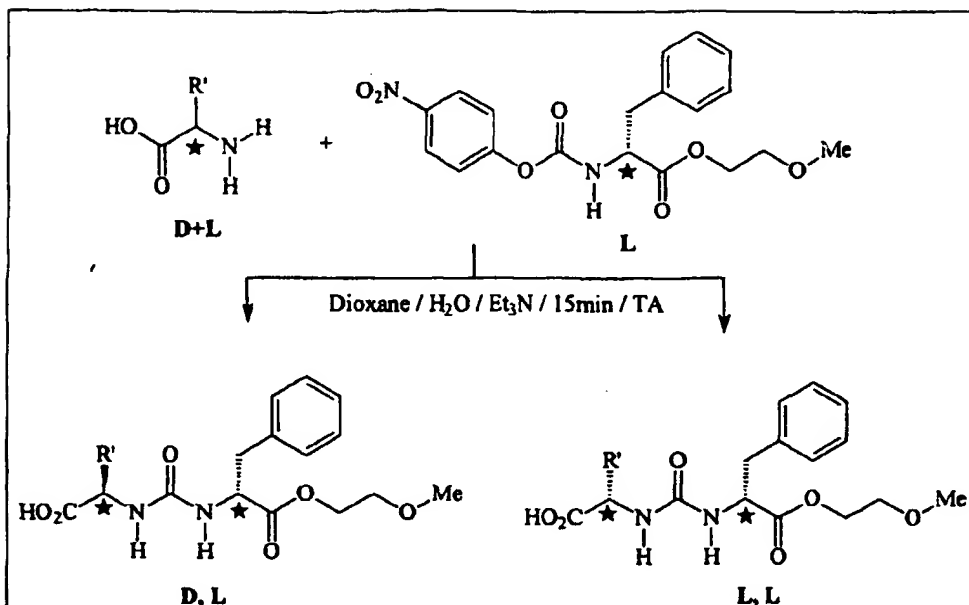
[0034] Le réactif selon l'invention peut être obtenu à partir de l'acide énantiopur respectif. Des méthodes connues sont utilisables pour effectuer l'estérification d'au moins un groupement carboxyle de l'acide. On peut, par exemple, mettre en œuvre l'acide énantiopur et l'alcool correspondant au substituant à introduire dans un solvant organique tel que par exemple le toluène ou le benzène, en présence d'acide p-toluènesulphonique, de préférence dans des conditions d'estérification azéotropique. Par cette voie de synthèse on obtient des dérivés de tosylate d'ammonium d'ester d'acide, qui conviennent bien pour introduire un groupement activant pour former un précurseur actif d'un groupement isocyanate.

[0035] A titre d'exemple de l'introduction d'un groupement activant, on cite la réaction d'un chlorure d'aryloxy-carbonyl avec le groupement $-\text{NH}_2$, éventuellement converti en dérivé d'ammonium, d'un acide ou d'un ester d'acide en milieu basique ou neutre dans un solvant organique polaire. A titre de base conviennent notamment des bases d'amine tertiaires tels que par exemple la triéthylamine ou la pyridine. Quand on travaille en milieu neutre, on préfère mettre en œuvre de l'hydrogène-carbonate de sodium. Ainsi des bons résultats sont obtenus lorsqu'on fait réagir un tosylate d'ammonium d'ester d'acide avec du chlorure de p-nitrophényloxy-carbonyl en présence d'hydrogène-carbonate de sodium dans un solvant organique polaire tel que l'acétonitrile.

[0036] Dans le procédé selon l'invention on fait réagir le réactif selon l'invention en milieu basique avec un mélange comprenant au moins des énantiomères comprenant au moins un groupement fonctionnel libre.

[0037] Le schéma 1 ci-après illustre de façon non limitative la réaction d'un réactif selon l'invention, obtenu à partir de l'ester 2-méthoxyéthyl de la L-phénylalanine et du chlorure de (4-nitrophénoxy)formate avec un acide. Les produits de cette réaction sont des urés comprenant deux acides dans lesquels au moins une fonction carboxyle est substituée avec un substituant.

Schéma 1



[0038] Généralement, le groupement fonctionnel libre est un groupement amino, éventuellement monoalkylé, un groupement hydroxyle ou un groupement thiol. Le groupement fonctionnel libre peut également être constitué d'un anion tel que par exemple un carbanion ou un énolate. Les énantiomères comprenant au moins un groupement fonctionnel libre séparables par le procédé selon l'invention sont généralement des aminoacides, des amines primaires ou secondaires, des peptides, des alcools, des hydroxyacides ou des thiols. Le procédé selon l'invention donne de bons résultats pour séparer les énantiomères d'aminoacides tels que, par exemple, les aminoacides d'origine naturelle ou synthétique mentionnés plus haut.

[0039] Le procédé selon l'invention donne de bons résultats également pour séparer un mélange d'énantiomères d'iminoacides. Par iminoacide on entend désigner tout composé comprenant au moins un groupement NHR, dans lequel R représente un radical organique tel que par exemple un radical alkyle ou aryle, et au moins un groupement carboxyle. De tels iminoacides sont par exemple ceux appartenant au groupe constitué de Proline, Acide pipécolique (Acide pipéridine-2-carboxylique), Acide morpholine-3-carboxylique, Acide pipérazine-2-carboxylique, Acide 1-Thia-4-azacyclohexane-3-carboxylique, α -Méthylproline, Cis-4-hydroxyproline, Baïkaine (Acide 1,2,3,5-tétrahydropyridine-2-carboxylique), Acide Cis-4-hydroxypipécolique, Acide Trans-5-hydroxypipécolique, Acide 1,2,3,4-tetrahydronorharmane-1-carboxylique, Acide 1,2,3,4-tétrahydro-6-hydroxyisoquinoline-3-carboxylique, Acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-3-carboxylique, Acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-1-carboxylique et N-Méthylvaline.

[0040] Le procédé selon l'invention est effectué dans un système de solvant, dans lequel le mélange d'énantiomères et le réactif possèdent une solubilité suffisante et le groupement fonctionnel libre possède une nucléophilicité suffisante pour réagir avec un isocyanate. Convienient, par exemple, à titre de système de solvant des systèmes comprenant au moins un solvant organique polaire et éventuellement de l'eau. Des solvants organiques polaires utilisables sont, par exemple les éthers aliphatiques ou alicycliques tels que le diéthyléther, le tétrahydrofurane ou le 1,4-dioxanne ainsi que les esters aliphatiques tels que par exemple l'acétate d'éthyle, les amides secondaires aliphatiques tels que par exemple la diméthylformamide et la diméthylacétamide ou par exemple la N-méthylpyrrolidone ou l'acétonitrile.

[0041] De bons résultats pour des composés organiques comprenant un groupement fonctionnel libre tel qu'un groupement amino, éventuellement monoalkylé, un groupement hydroxyl aryle ou un groupement thiol sont obtenus dans un système de solvant comprenant un solvant organique polaire et de l'eau. Le dioxanne est préférée à titre de solvant organique polaire. Le rapport pondéral entre le solvant organique polaire et l'eau dans le système de solvant est généralement inférieur ou égal à 99:1. Le plus souvent, le rapport est inférieur ou égal à 75:25. Le rapport est généralement supérieur ou égal à 1:99. Le plus souvent, le rapport est supérieur ou égal à 25:75.

[0042] L'invention concerne aussi une solution du réactif selon l'invention dans un solvant organique polaire tel que par exemple les solvants organiques polaires décrits ci-avant. La concentration du réactif dans la solution est généralement d'au moins $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. De préférence, la concentration est d'au moins $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l. La concentration du réactif dans la solution est généralement d'au plus $1 \cdot 10^{-1}$ mol/l. De préférence, la concentration est d'au plus $6 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Dans la solution selon l'invention on préfère utiliser un solvant organique polaire de pureté analytique. Si sou-

hachable, la solution selon l'invention peut contenir des additifs tels que, par exemple, des stabilisants.

[0043] L'invention concerne également l'utilisation de la solution selon l'invention dans un appareil automatique de dérivation et de séparation d'énantiomères de composés organiques comprenant au moins un groupement fonctionnel libre. La quantité du réactif à mettre en œuvre dépend du nombre de groupements fonctionnels libres dans le composé organique. On met en œuvre au moins 1 équivalent molaire de réactif par groupement fonctionnel libre. Généralement, on met en œuvre au plus 10 équivalents molaires de réactif par groupement fonctionnel libre. Le plus souvent, on met en œuvre au plus 5 équivalents molaires de réactif par groupement fonctionnel libre. De préférence, on met en œuvre au plus 3 équivalents molaires de réactif par groupement fonctionnel libre. De manière particulièrement préférée, on met en œuvre de 1,1 à 2,5 équivalents molaires de réactif par groupement fonctionnel libre.

[0044] Le caractère basique du milieu réactionnel est généré par des méthodes connues. On travaille, de préférence, en présence d'au moins une base. A titre de base conviennent notamment des bases d'amine tertiaires tels que par exemple la triéthylamine ou la diisopropyléthylamine, qui comprennent une fonctionnalité basique respectivement ou la N,N,N,N-tétraméthyléthylènediamine qui comprend 2 fonctionnalités basiques.

[0045] La quantité de base à mettre en œuvre dépend de la quantité du réactif et du nombre de fonctionnalités basiques dans la base. Le rapport molaire entre le réactif et les fonctionnalités basiques est généralement d'au moins 1. Le rapport est généralement d'au plus 2. Un rapport de 1 donne de bons résultats.

[0046] Dans le procédé selon l'invention, la durée pendant laquelle on fait réagir le réactif avec le mélange comprenant les énantiomères est généralement inférieure ou égale à 30 min. Le plus souvent, la durée est inférieure ou égale à 20 min. De préférence la durée est inférieure ou égale à 15 min. De bons résultats sont obtenus avec une durée supérieure ou égale à 15 secondes. En pratique, on applique le plus souvent une durée supérieure ou égale à 1 min. Une durée de 5 à 15 min convient bien.

[0047] La température à laquelle on fait réagir le réactif avec le mélange comprenant au moins les énantiomères d'un composé organique est généralement inférieure ou égale à 35 °C. Le plus souvent, la température est inférieure ou égale à 30 °C. La température est généralement supérieure ou égale à -20 °C. Le plus souvent, la température est supérieure ou égale à 0 °C. De façon particulièrement préférée, la température est la température ambiante, c'est-à-dire généralement de 15 à 30 °C, de préférence 20 à 25 °C.

[0048] Dans le procédé selon l'invention, on soumet le mélange de diastéréomères obtenu à une opération de séparation. Les opérations de séparation utilisables pour la séparation d'un mélange de diastéréomères sont décrites par exemple dans E. Eliel, Stereochemistry of Organic compounds, 1994, p. 344-381. A titre d'exemple citons les opérations de distillation, de cristallisation et de chromatographie gazeuse ou liquide. Parmi ces opérations, les opérations de chromatographie liquide telles que par exemple la chromatographie HPLC sont préférées. De façon particulièrement préférée, l'opération de séparation est une chromatographie HPLC-RP (phase inverse). Des informations concernant la chromatographie HPLC sont contenues, par exemple, dans RÔMPP CHIMIE-LEXIKON, 9. Ed., p. 1860-1861. On peut également mettre en œuvre la chromatographie en couche mince.

[0049] Des éluants utilisables dans une opération de chromatographie sont connus. Dans le cas où le procédé selon l'invention comprend à titre d'opération de séparation une chromatographie HPLC-RP, de bons résultats ont été obtenus avec un éluant comprenant de l'acétonitrile ou du méthanol.

[0050] Dans une variante du procédé selon l'invention, qui est préférée, on soumet le mélange de diastéréomères obtenu à l'opération de séparation sans épuration préalable. Dans des méthodes de séparation d'énantiomères connues, on isole un mélange brut de diastéréomères qui doit être soumis à une épuration préalablement à la séparation des diastéréomères. Le procédé et le réactif selon l'invention permettent de ne pas isoler le mélange brut de diastéréomères et d'effectuer l'opération de séparation sans épuration préalable.

[0051] Le procédé et le réactif selon l'invention peuvent être utilisés pour la séparation préparative ou analytique d'énantiomères. Le procédé et le réactif conviennent bien pour la séparation analytique d'énantiomères. Dans une variante, le procédé et le réactif sont utilisés pour déterminer l'excès énantiomérique d'un aminoacide ou d'une amine primaire ou secondaire. Dans une autre variante, le procédé ou le réactif sont utilisés pour déterminer l'excès énantiomérique d'un peptide.

[0052] L'invention concerne également un procédé pour l'obtention d'un composé énantiopur comprenant au moins un groupement fonctionnel libre dans lequel

(a) on soumet un mélange comprenant les énantiomères du composé comprenant au moins un groupement fonctionnel libre au procédé de séparation selon l'invention

(b) on effectue une opération de clivage d'un diastéréomère pur obtenu par séparation du mélange de diastéréomères

(c) on récupérer le composé énantiopur.

[0053] A titre d'opération de clivage on peut utiliser, par exemple, une opération d'hydrazinolyse dans un solvant tel que, par exemple, un alcool.

[0054] Lorsqu'on utilise le procédé ou le réactif selon l'invention pour la séparation analytique d'énantiomères, on met en œuvre une technique de détection connue en elle-même pour la détermination de la teneur du mélange en énantiomères. Conviennent bien à titre de technique de détection, les techniques optiques telles que par exemple la spectrométrie UV, la spectrométrie visible ou la fluorimétrie.

[0055] Les exemples ci-après entendent illustrer l'invention sans toutefois la limiter.

Exemple 1 (Synthèse du réactif selon l'invention)

Etape A

[0056] Dans un ballon monocol, on a introduit 1 équivalent d'acide aminé énantiopur, 1,5 équivalent d'acide paratoluène sulfonique monohydrate, 50 équivalents de toluène PA et 5 équivalents de Méthoxyéthanol. Le mélange a été chauffé au reflux et l'eau a été éliminée au moyen d'un Dean-Stark. Après 4 heures de reflux, le mélange réactionnel a été refroidi à température ambiante et dilué par de l'éther éthylique. Le mélange réactionnel dilué a été placé au frigo pendant 16 heures. Le solide blanc obtenu a été filtré, lavé à l'éther et séché sous vide.

Etape B

[0057] Dans un ballon monocol, on a pesé du NaHCO_3 (2,6 équivalents) et on a introduit sous courant d'azote l'acétonitrile ($5 \cdot 10^{-3}$ mole dans 36 ml). Le mélange a été refroidi à 0°C et on a introduit successivement du (4-nitrophénoxy)chloroformate (1 équivalent) suivi du sel d'ammonium de l'acide aminé énantiopur obtenu selon exemple 1, étape A (1 équivalent). Le mélange a été agité vigoureusement 1 heure à 0°C et a été ensuite remonté à température ambiante pendant 4 heures. Ce temps écoulé, le mélange a été transféré dans une ampoule à décanter, a été dilué par une solution 1 molaire d'HCl et extrait trois fois à l'éther. Les phases organiques combinées ont été séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit brut a été soumis à un traitement d'épuration approprié.

Exemple 2

[0058] On a effectué les étapes A et B en mettant en œuvre la L-phénylalanine à titre d'acide aminé énantiopur. Le produit brut a été recristallisé dans l'isopropanol jusqu'à l'obtention de la pureté désirée. Le rendement de l'étape B a été 64 %. On a obtenu un solide cristallin qui était stable au stockage à température ambiante.

[0059] Le réactif ainsi obtenu a présenté les données analytiques suivantes :

RMN (^1H)	(référence Dioxanne à 3,71 ppm; produit dissous dans le dioxanne-d6)
8,40 (2H, d)	2H du (4-nitrophénoxy)carbonyl
7,44 (7H, m)	2H du (4-nitrophénoxy)carbonyl et 5H du phényl
7,31 (1H, d)	NH du carbamate
4,83 (1H, m)	CH de la Phénylalanine
4,41 (2H, m)	$\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$
3,70 (2H, m)	CH_2OMe
3,47 (3H, s)	CH_3O
3,27 (2H, AB)	2H benzyliques

[0060] La Résonance magnétique nucléaire (RMN) a été effectuée, dans tous les cas pour lesquels un spectre RMN est indiqué, avec un spectromètre Appareil Brücker AMX 500 MHz. Les déplacements chimiques sont indiqués en ppm par rapport à la résonance du TMS (tétraméthylsilane). Pour les allures des résonances les abréviations suivantes sont utilisées : m=multiplet, s=singulet, d=doublet, t=triplet, q=quadruplet. Le nombre nH indique le nombre de protons correspondant au signal.

Point de fusion	$71-72^\circ\text{C}$
Rotation optique	$[\alpha] : +42,608$ (c=0,86 gr/100 ml dans le dioxanne; $T^\circ = 26^\circ\text{C}$, $\lambda = 589\text{ nm}$)

[0061] La chromatographie en couche mince (CCM) a été effectuée en utilisant des plaques de silicagel MERCK 60F-254. Rapport frontal = 0,45 (Eluant Diéthyléther/Ether de pétrole : mélange 75/25 en volume).

EP 1 046 627 A2

Exemples 3-48 (Dérivatisation et séparation de mélanges d'énantiomères)

[0062] Dans un vial de 10 ml, on a pesé précisément le mélange d'énantiomères d'un composé organique comprenant au moins un groupement fonctionnel libre selon les exemples 3-48 (voir tableau) (1 équivalent) que l'on a dissout dans de l'eau distillée (concentration $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) en présence de triéthylamine. Le rapport molaire de la triéthylamine par rapport au réactif a été 1. Dans un second vial de 10 ml, on a introduit le réactif obtenu selon l'exemple 1 dans lequel l'acide aminé était la L-phénylalanine. Le réactif a été dissout dans du dioxane de pureté analytique (concentration $3 \cdot 10^{-2}$ mol/l). On a transféré via seringue, et sous agitation vigoureuse, la solution aqueuse de l'acide aminé dans la solution du réactif de dérivation. Après 15 minutes d'agitation à température ambiante, on a prélevé 500 µl du mélange réactionnel que l'on a dilué par 500 µl de dioxane. Cette solution a été analysée par HPLC en phase inverse par injection de 10 µl de solution sur une colonne VYDAC®.

[0063] Les suivantes conditions standards ont été utilisées pour les exemples de séparation de mélanges d'énantiomères par HPLC.

[0064] On a utilisé une colonne VYDAC® Reverse Phase C18 CAT 201TP54.

[0065] On a employé pour l'élution un mélange Acétonitrile / H₂O avec un gradient en acétonitrile de 1.58 % / min en présence de 0.1 % en volume d'acide trifluoroacétique.

[0066] La détection a été effectuée par spectrométrie UV à 205 et 220 nm.

[0067] Le tableau 1 ci-après rassemble les mélanges d'énantiomères qui ont été mis en oeuvre avec le réactif obtenu selon l'exemple 1 et les résultats de séparation obtenus.

Tableau 1

Ex.	Mélange d'énantiomères	Tr L,L ^(a)	Tr D,L ^(b)	α ^(c)	Rs ^(d)	Quantité de réactif ^(e) (Equivalents)
3	Alanine	15.08	16.40	1.096	6.01	2
4	Valine	18.73	20.94	1.127	10.83	2
5	Norvaline	19.28	21.26	1.11	9.45	2
6	Leucine	21.53	23.50	1.098	8.96	2
7	Norleucine	22.06	23.96	1.091	8.78	2
8	Isoleucine	21.08	23.46	1.120	11.55	2
9	Thréonine	14.39	15.41	1.078	4.76	2
10	Allothréonine	14.39	14.85	1.036	2.09	2
11	Méthionine	18.97	20.59	1.092	7.74	2
12	Ethionine	21.26	22.89	1.082	7.77	2
13	Acide Glutamique	14.56	15.00	1.033	2.07	2
14	Acide Aspartique	14.22	14.66	1.034	2.08	2
15	Cystéine	26.65	27.19	1.021	2.85	5*
16	Cystine	25.59	26.08	1.020	2.76	4*
17	Proline	17.09	17.75	1.042	2.75	2
18	Phénylalanine	22.64	24.08	1.068	6.25	2
19	Tyrosine	28.82	29.24	1.015	1.99	5*
20	Tryptophane	22.79	24.03	1.058	6.54	2
21	Ornithine	24.44	24.92	1.021	2.26	6*
22	Acide pipéridine-2-carboxylique (Acide pipécolique)	19.86	20.62	1.041	3.51	2
23	Acide morpholine-3-carboxylique	16.05	15.56	1.034	2.28	2

EP 1 046 627 A2

Tableau 1 (suit)

	Ex.	Mélange d'énantiomères	Tr L,L ^(a)	Tr D,L ^(b)	α ^(c)	R ^(d)	Quantité relative ^(e) (Equivalent)
5	24	Acide 1-Thia-4-azacyclohexane-3-carboxylique	18.76	19.43	1.038	3.30	2
	25	(2-Naphtyl) alanine	27.43	28.53	1.042	5.19	2
10	26	Homophénylalanine	24.71	26.20	1.064	7.94	2
	27	(4-Chlorophényl) alanine	25.91	27.20	1.053	5.58	2
	28	(4-Fluorophényl) Alanine	23.65	25.033	1.062	6.53	2
15	29	(3-Pyridyl)alanine	14.32	13.57	1.061	3.20	2
	30	Phénylglycine	20.98	22.69	1.087	8.24	2
	31	2-Méthylproline	19.29	20.55	1.07	5.76	2
	32	Cis-4-Hydroxyproline	13.92	14.44	1.041	2.19	2
20	33	Baikaine	19.05	20.27	1.069	6.03	2
	34	Acide Cis-4-hydroxy pipécolique	15.12	15.91	1.058	3.97	2
25	35	Acide Trans-5-hydroxy pipécolique	13.76	14.36	1.049	2.70	2
	36	Acide 2-amino-butyrique	16.84	18.64	1.116	8.31	2
	37	Acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-3-carboxylique	23.71	24.75	1.046	4.89	2
30	38	Acide 1,2,3,4-tétrahydro-isoquinoline-1-carboxylique	23.66\$	24.67\$	1.045	4.75	2
	39	Erythro β-Méthyl phenylalanine	24.03\$	25.73\$	1.075	8.67	2
35	40	Threo β-Méthyl phenylalanine	23.79\$	25.56\$	1.079	7.22	2
	41	o-Methoxy-Phenylalanine	23.08\$	24.31\$	1.057	5.64	2
	42	Acide 1,2,3,4-tetrahydronorharmane-1-carboxylique	26.26\$	27.09\$	1.031	3.44	5*
40	43	Acide 1,2,3,4-tétrahydro-6-hydroxy isoquinoline-3-carboxylique	29.14\$	29.67\$	1.019	2.49	5*
45	44	Acide 2-amino heptane 1,7diolique	18.09\$	19.21\$	1.067	6.41	2
	45	Erythro β-Méthyltyrosine	29.84\$	30.53\$	1.024	3.65	5*
	46	Threo β-Méthyltyrosine	29,51\$	30.07\$	1.02	2.97	5*
	47	N-Méthylvaline	21.47	22.59	1.056	5.62	2
50	48	2-Hydroxyméthyl pipéridine	19.79	20.4	1.033	2.73	2

Legende pour les tableaux 1 à 6

55 [0068]

(a) Temps de rétention correspondant au dérivé de l'énantiomère L (L,L)

(b):Temps de rétention correspondant au dérivé de l'énantiomère D (D,L)

(c):Facteur de séparation; $\alpha = (Tr_2 - Tr_0)/(Tr_1 - Tr_0)$ où Tr_2 et Tr_1 sont les temps de rétention respectivement des deuxième et premier composé et Tr_0 est le temps de rétention d'un composé non retenu.

(d):Facteur de résolution;

$$R_s = 0.25 \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \sqrt{N_2}$$

où k'_2 est le facteur de capacité du second composé et N le nombre de plateaux théoriques.

*Dérivatisation également de la fonction portée par la chaîne latérale.

* L'attribution des temps de rétention aux isomères (L,L) et (D,L) respectivement n'est pas certaine car le mélange d'énantiomères soumis à la séparation était racémique.

Exemple 49

[0069] On a effectué les étapes A et B en mettant en oeuvre la L-(2-naphtyl)alanine à titre d'acide aminé énantiopur. Le produit brut a été recristallisé dans l'isopropanol jusqu'à l'obtention de la pureté désirée. Le rendement de l'étape B a été 77 %. On a obtenu un solide cristallin qui était stable au stockage à température ambiante.

[0070] On a obtenu le spectre RMN suivant du réactif :

RMN (H1)	(référence Dioxanne à 3,71 ppm; produit dissous dans le dioxanne-d6)
8,20 (2H, d)	2H du (4-nitrophényloxy)carbonyl
7,79 (4H, m)	4H du naphtyl
7,45 (3H, m)	3H du naphtyl
7,21 (3H, m)	2H du (4-nitrophényloxy)carbonyl et 1H du naphtyl
4,78 (1H, m)	CH du Naphtylalanine
4,27 (2H, m)	CH ₂ OC=O
3,52 (2H, m)	CH ₂ OMe
3,28 (3H, s)	CH ₃ O
3,29 (2H, AB)	2H benzyliques
Point de fusion	76-77 °C
Rotation optique	[α] : 83,5 (c = 1,025 gr/100 ml dans le dioxanne; T° = 26 °C, λ = 589 nm)

[0071] La chromatographie en couche mince (CCM) a été effectuée en utilisant des plaques de silicagel MERCK® 60F-254. Ancien Rapport frontal = 0,4 (Eluant Diéthyléther/Ether de pétrole : mélange 75/25 en volume).

[0072] On a effectué la réaction de l'ester 2-méthoxyéthyl de la L-N-(4-nitrophénoxy)carbonyl-(2-naphtyl)alanine avec un mélange d'énantiomères d'arginine et l'opération de séparation dans les conditions des exemples 3-48. On a mis en oeuvre 2 équivalents de réactif et 2 équivalents de triéthylamine par équivalent d'arginine.

[0073] Le tableau 2 ci-après montre le résultat de séparation obtenu.

Tableau 2

Exemple	Mélange d'énantiomères	Tr L,L (a)	Tr D,L (b)	α (c)	Rs (d)	Quantité de réactif (e) (Equivalents)
49	Arginine	20.168	19.625	1.030	1.73	2

Exemple 50

[0074] On a effectué la réaction de l'ester 2-méthoxyéthyl de la L-N-(4-nitrophénoxy)carbonyl-β-tryptophane avec un mélange d'énantiomères de valine et l'opération de séparation dans les conditions des exemples 3-48. On a mis en oeuvre 2 équivalents de réactif et 2 équivalents de triéthylamine par équivalent de valine.

[0075] Le tableau 3 ci-après montre le résultat de séparation obtenu.

Tableau 3

Ex mpl	Mélange d'isomères	Tr L,L (a)	Tr D,L (b)	α (c)	Rs (d)	Quantité de réaction (e) (Equivalents)
50	Valine	19.19	20.42	1.069	5.80	2

Exemple 51 : Préparation de l'estér 4-nitrobenzyle de la N-((4-nitrophénoxy)carbonyl de phénylalanine)

Etape A :

[0076] Dans un ballon monocol, on a introduit 4 gr (1 éq.) de Z-(L)-Phénylalanine, 2,89 gr (1 éq.) de bromure de 4-nitrobenzyle et 26 ml (25 éq.) de diméthylformamide. On a additionné alors sous azote 1.55 gr (2 éq.) de fluorure de potassium sec. Le mélange a été agité à 60 °C pendant 16 heures. Le mélange réactionnel a été refroidi à température ambiante et dilué par 100 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique a été lavée par deux fois 100 ml d'une solution de NaHCO₃ à 5 % ainsi que par deux fois 100 ml d'eau. La phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le solide obtenu a été séché à l'étuve une nuit.
Rendement : 6,3 gr (85 %)

Etape B :

[0077] Le solide obtenu dans l'étape 1 a été dilué dans 25 ml d'acide acétique glacial. On a ajouté prudemment 6,9 ml (3 éq.) d'une solution à 33 % en poids d'HBr dans l'acide acétique. Le mélange est agité une heure et demi à température ambiante. Le mélange a été dilué par 200 ml d'éther éthylique et le précipité blanc formé a été filtré et lavé par trois fois 200 ml d'éther éthylique. Le solide a été séché à l'étuve pendant une nuit.
Rendement : 5,53 gr (99 %)

Etape C :

[0078] Dans un ballon monocol, on a pesé 0,82 gr de NaHCO₃ (2,6 éq.) et on a introduit sous courant d'azote 27 ml d'acétonitrile (135 éq.). Le mélange a été refroidi à 0 °C et on a introduit successivement 0,81 gr (1 éq.) de chlorure de (4-nitrophénoxy)carbonyl suivi de 1,5 gr (1 éq.) du sel de brome du dérivé de la phénylalanine-4-nitrobenzyle. Le mélange a été agité vigoureusement 1 heure à 0 °C et a été ensuite remonté à température ambiante pendant 11 heures. Ce temps écoulé, le mélange a été transféré dans une ampoule à décanter, a été dilué par 60 ml d'une solution 1M d'acide chlorhydrique et a été extrait par trois fois 60 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques combinées ont été séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner un solide beige. Celui-ci a été trituré dans 50 ml d'éther et filtré.

Rendement	1,44 gr (82 %)
RMN (H1)	(référence Méthanol à 3,32 ppm; produit dissous dans le Méthanol-d4)
8,32 (2H, d)	2H du 4-nitrophénoxy-carbonyl
8,28 (2H, d)	2H du 4-nitrobenzyle
7,63 (2H, d)	2H du 4-nitrophénoxy-carbonyl
7,34-7,41 (7H, m)	2H du 4-nitrobenzyle et 5H du phényl
5,37 (2H, s)	CH ₂ benzylique du 4-nitrobenzyle
4,65 (1H, m)	CH de la Phénylalanine
3,23 (2H, AB)	CH ₂ benzyliques de la phénylalanine
Point de fusion	118,3 °C
Rotation optique	[α] : + 20,83 (c = 0.96 gr/100 ml dans le dioxane; T° = 24 °C, λ = 589 nm)

[0079] La chromatographie en couche mince (CCM) a été effectuée en utilisant des plaques de silicagel MERCK® 60F-254. Rapport frontal = 0,4 (Eluant Diéthyléther/Ether de pétrole : mélange 75/25 en volume).

Exemple 52

[0080] Le tableau 4 présente le résultat de séparation d'un mélange d'énantiomères de valine qui a été mis en oeuvre avec le réactif obtenu selon l'exemple 51 selon le mode opératoire de l'exemple 3.

[0081] La détection a été effectuée par spectrométrie UV à 205, 220 et 270 nm.

Tableau 4

Ex.	Mélange d'énantiomères	Tr L,L (a)	Tr D,L (b)	α (c)	Rs (d) (nm)	Equivalents de réactifs	Rs (nm)
52	Valine	26.207	27.246	1.042	3.92 (205 nm)	2	4.77 (220 - 270)

[0082] On a observé que ce réactif permet une détection à 220 nm et 270 nm. On a obtenu, à ces longueurs d'ondes, un facteur de séparation plus grand que lorsqu'on a effectué la détection à 205 nm.

Exemple 53

[0083] On a synthétisé suivant le mode opératoire de l'exemple 51, l'ester 2-méthylanthraquinone de la N-((4-nitrophénoxy)carbonyl)phénylalanine. Le tableau 5 présente le résultat de séparation d'un mélange d'énantiomères de valine qui a été mis en oeuvre avec le réactif obtenu selon l'exemple 51 selon le mode opératoire de l'exemple 3.

[0084] La détection a été effectuée par spectrométrie UV à 205, 220, 270 et 330 nm.

Tableau 5

Ex.	Mélange d'énantiomères	Tr L,L (a)	Tr D,L (b)	α (c)	Rs (d) (nm)	Equivalents de réactifs	Rs (nm)
53	Valine	30.168	30.884	1.025	3.01 (205 nm)	2	3.11 (270 et 330)

[0085] On a observé que ce réactif permet une détection à 270 nm et 330 nm. On a obtenu, à ces longueurs d'ondes, un facteur de séparation légèrement plus grand que lorsqu'on a effectué la détection à 205 nm.

[0086] Il apparaît que le réactif selon l'invention peut être obtenu facilement. Le réactif selon l'invention présente une bonne stabilité à température ambiante.

[0087] Le procédé selon l'invention permet de séparer une grande variété de composés organiques chiraux comprenant au moins un groupement fonctionnel libre, de manière simple, rapide et dans des conditions uniformes de séparation sans devoir isoler le produit de la réaction préalablement à l'étape de séparation.

Exemple 54

[0088] Dans un ballon monocol, on a pesé du NaHCO_3 (2.6 équivalents) et on a introduit sous courant d'azote l'acétonitrile (12.10-3 mole dans 83ml). Le mélange a été refroidi à 0°C et on a introduit successivement du 4-fluorophénoxychlorothionoformate (1 équivalent) suivi du sel d'ammonium d'acide aminé obtenu selon l'exemple 1, étape A (1 équivalent). Le mélange a été agité vigoureusement 1 heure à 0°C et a été ensuite remonté à température ambiante pendant 4 heures. Ce temps écoulé, le mélange a été transféré dans une ampoule à décanter, a été dilué par une solution 1 molaire d'HCl et extrait trois fois à l'éther. Les phases organiques combinées ont été séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit brut a été soumis à un traitement d'épuration approprié. Le réactif ainsi obtenu a été le (S)-N-(4-Fluoro-phenoxythiocarbonyl)phénylalanine méthoxyethyl ester. Il a présenté les données analytiques suivantes :

RMN (^1H): (réf Dioxanne à 3,71ppm; produit dissous dans le dioxanne- d_6)

8,88 (2H, d) : 2H du 4-fluorophénoxycarbonyl

7,20-7,49 (7H, m) : 2H du 4-fluorophénoxythiocarbonyl et 5H du phényl

6,99 (1H, d) : NH du carbamate

5,36 (1H, m) : CH de la Phénylalanine

4,42 (2H, m) : $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$

3,69 (2H, m) : CH_2OMe

3,48 (3H, s) : CH_3O

3,41 (2H, AB) : 2H benzylique

Exemples 55-57

[0089] On a effectué la dérivatisation et séparation des mélanges d'énantiomères de composés organiques comprenant un groupement fonctionnel libre des exemples 55-57 (tableau) dans les conditions des exemples 3-48, en utilisant comme réactif le réactif obtenu dans l'exemple 54. La détection a été effectuée à 245nm uniquement. Le tableau ci-après montre les résultats de séparation obtenus.

Tableau 6

Exemples	Mélange d'énantiomères	Tr L,L (a)	Tr D,L (b)	α (c)	RS (d)	Quantité de réactif (Equivalents)
55	Valine	24.79	22.11	1.129	12.89	2
56	Proline	19.42	21.22	1.099	7.68	2
57	Tyrosine	22.14	23.26	1.054	4.4	5

[0090] Le réactif permet une séparation très efficace d'énantiomères. La détection par spectrométrie UV peut être effectuée à une seule longueur d'ondes et elle est hautement sensible.

Revendications

1. Procédé pour la séparation d'énantiomères comprenant au moins un groupement fonctionnel libre dans lequel

(a) on fait réagir un mélange comprenant les énantiomères en milieu basique avec un réactif à base d'un aminoacide énantiopur, réactif dans lequel au moins un groupement amino de l'acide porte un groupement activant pour former un précurseur actif d'un groupement isocyanate et dans lequel au moins un groupement carboxyle de l'acide est substitué et

(b) on soumet le mélange de diastéréomères obtenu à une opération de séparation.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le groupement carboxyle de l'acide est substitué avec un substituant hydrophile et/ou un substituant comprenant au moins un chromophore.

3. Procédé selon la revendication 2 dans lequel le substituant hydrophile dans le réactif est un groupement 2-méthoxyéthyl.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel le groupement activant dans le réactif est un groupement (4-nitrophényloxy)carbonyl.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le réactif est à base d'un aminoacide énantiopur sélectionné parmi le groupe constitué de Alanine, Valine, Norvaline, Leucine, Norleucine, Isoleucine, Sérine, Isosérine, Homosérine, Thréonine, Allothrénine, Méthionine, Ethionine, Acide Glutamique, Acide Aspartique, Asparagine, Cystéine, Cystine, Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane, Lysine, Arginine, Histidine, Ornithine, Glutamine, Citrulline, (1-Naphtyl)alanine, (2-Naphtyl)alanine, Homophénylalanine, (4-Chlorophényl)alanine, (4-Fluorophényl)alanine, (3-Pyridyl)alanine, Phénylglycine, Acide Diaminopimélique (Acide 2-6-Diaminoheptane-1,7-dioïque), Acide 2-aminobutyrique, Acide-2-aminotétraline-2-carboxylique, Erythro β -Méthylphenylalanine, Threo β -Méthylphenylalanine, (2-Méthoxyphényl)alanine, Acide 1-amino-5-hydroxyindane-2-carboxylique, Acide 2-Aminoheptane-1,7-dioïque, (2,6-Diméthyl-4-hydroxyphényl)alanine, Erythro β -Méthyltyrosine et Threo β -Méthyltyrosine.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans lequel on fait réagir le mélange d'énantiomères avec le réactif à température ambiante pendant une durée inférieure ou égale à 15 minutes et on soumet le mélange de diastéréomères obtenu à l'opération de séparation sans épuration préalable.

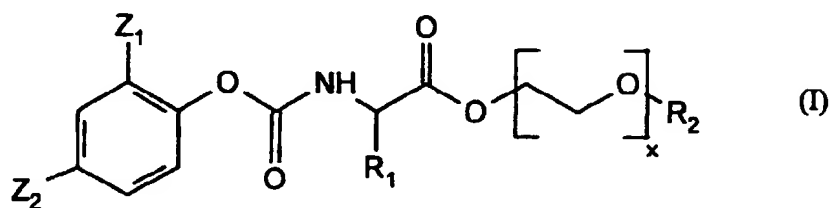
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel l'opération de séparation est une chromatographie HPLC.

8. Réactif à base d'un aminoacide énantiopur dans lequel au moins un groupement amino de l'acide porte un groupement activant pour former un précurseur actif d'un groupement isocyanate ou isothiocyanate dans lequel

au moins un groupement carboxyle de l'acide aminé est substitué.

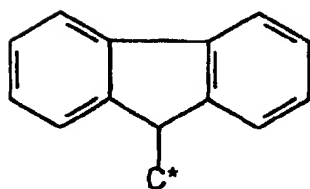
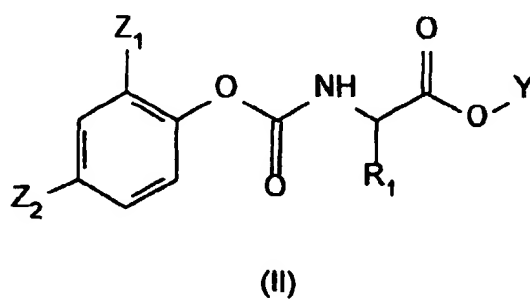
9. Réactif selon la revendication 8, dans lequel au moins un groupement amino de l'acide aminé énantiopur porte un groupement activant pour former un précurseur actif d'un groupement isocyanate.

10. Réactif selon la revendication 9, répondant à la formule générale (I)

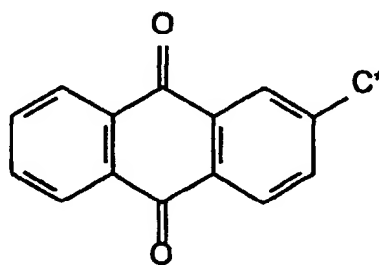


dans laquelle Z_1 et/ou $\text{Z}_2 = \text{NO}_2$, $\text{R}_1 = \text{Phényl}$, α ou β -Indolyl, 1-Naphtyl ou 2-Naphtyl, $\text{R}_2 = \text{Me}$, Et, C3-C6 alkyl ou cycloalkyl et x représente un nombre intégral de 1 à 5.

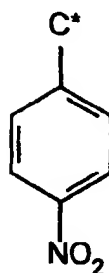
11. Réactif selon la revendication 9 comprenant au moins un chromophore, répondant à la formule générale (II)



(III)



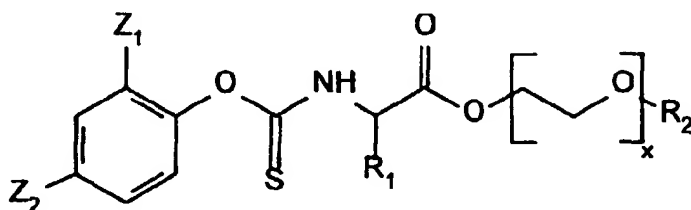
(IV)



(V)

dans laquelle Z_1 et/ou $Z_2 = \text{NO}_2$ $R_1 =$ Phényl, α ou β -Indolyl, 1-Naphtyl ou 2-Naphtyl, et Y correspond à l'une quelconque des formules III à V, le carbone par lequel Y est lié à l'oxygène du groupement carboxyle de l'acide énantio pur étant marqué par *.

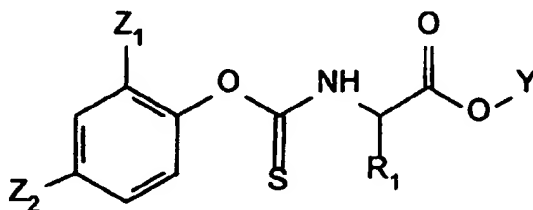
12. Réactif selon la revendication 8 répondant à la formule générale (VI)



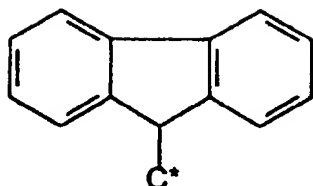
(VI)

dans laquelle Z_1 et/ou $Z_2 = \text{NO}_2$ ou F, $R_1 =$ Phényl, α ou β -Indolyl, 1-Naphtyl ou 2-Naphtyl, $R_2 = \text{Me}$, Et, C3-C6 alkyl ou cycloalkyl et x représente un nombre intégral de 1 à 5.

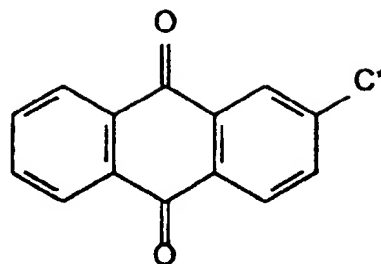
13. Réactif selon la revendication 8 comprenant au moins un chromophore, répondant à la formule générale (VII)



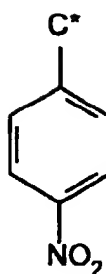
(VII)



(III)



(IV)



(V)

dans laquelle Z_1 et/ou $Z_2 = \text{NO}_2$ $R_1 = \text{Phényl}$, α ou β -Indolyl, 1-Naphtyl ou 2-Naphtyl, et Y correspond à l'une quelconque des formules III à V, le carbone par lequel Y est lié à l'oxygène du groupement carboxyle de l'acide énantiopur étant marqué par *.

14. Solution du réactif selon l'une quelconque des revendications 8 à 12 dans un solvant organique polaire.
15. Utilisation de la solution selon la revendication 13 dans un appareil automatique de dérivation et de séparation d'énantiomères de composés organiques comprenant au moins un groupement fonctionnel libre.
16. Utilisation du procédé, du réactif ou de la solution selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour la séparation d'énantiomères d'un acide aminé, d'une amine primaire ou secondaire ou d'un peptide.
17. Procédé pour l'obtention d'un composé énantiopur comprenant au moins un groupement fonctionnel libre dans lequel
 - (a) on soumet un mélange comprenant les énantiomères du composé comprenant au moins un groupement fonctionnel libre au procédé de séparation selon l'invention
 - (b) on effectue une opération de clivage d'un diastéréomère pur obtenu par séparation du mélange de diastéréomères
 - (c) on récupère le composé énantiopur.